

KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**ANTIVIRÁLIS HATÁSÚ NUKLEOZID  
ÉS NUKLEOTID ANALÓGOK SZINTÉZISE**

Sági Gyula

Magyar Tudományos Akadémia  
Központi Kémiai Kutató Intézete  
Budapest  
1994

## Az értekezés előzményei, célkitűzések

Az MTA Központi Kémiai Kutató Intézete Bioorganikus Kémiai Osztályán több mint két évtizede folynak bázis és cukorrészen módosított nukleozidok és nukleotidok szintézisével és biokémiai vizsgálatával kapcsolatos kutatások. E munka korábbi szakaszában számos új 5-szubsztituált 2'-dezoxiuridin előállítására került sor, amelyek közül a legjobb antiherpetikus aktivitással rendelkező 5-izopropil analóg *Hevizos* néven gyógyszerként is bevezetésre került.

A kismolekulák (nukleozidok) után a 80-as évek elejétől világszerte egyre inkább az ún. "antisense" oligonukleotidok kerültek az érdeklődés középpontjába. Ezek a ~15-25 nukleotidegységből álló, a vírus (vagy onkogén) célszekvenciával komplementer bázisszekvenciájú, módosított oligomerek specifikus módon gátolják a kórokozók szaporodását. 1985-től osztályunkon is nagy intenzitással folyik az ilyen típusú oligomerek szintézise és biokémiai tulajdonságainak tanulmányozása. Ebbe a munkába bekapcsolódva célul tűztük ki olyan új nukleozidok szintézisét, amelyek az említett oligomerek alkotóelemeiként előnyösen befolyásolják azok biológiai aktivitását, másrészt - mint potenciális antivirális ágensek - önmagukban is hatásosak lehetnek.

Értekezésem három fő részre tagolódik: 1, optikailag aktív karbociklusos nukleozidok szintézise, 2, 8-szubsztituált 2'-dezoxiadenozin analógok előállítása, 3, sztereokémiai egységes, módosított dinukleotidok és ezek 3'-aktív foszfitjainak szintézise.

## Alkalmazott vizsgálati módszerek

Szintetikus munkám során a modern preparatív szerves kémia makro- és félmikro-módszereit alkalmaztam. A reakciók követésére vékonyrétegkromatográfiás vizsgálatokat használtam.

Egyes intermedierek és végtermékek tisztítása ismert elválasztástechnikai módszerekkel (száraz oszlop flash kromatográfia, gravitációs szilikagél oszlop-kromatográfia) történt.

Új vegyületek szerkezetigazolását modern szerkezetvizsgáló módszerekkel (UV, IR, CD, MS,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  és  $^{31}\text{P}$  NMR spektroszkópiával valamint röntgen-diffrakciós analízissel) végeztem.

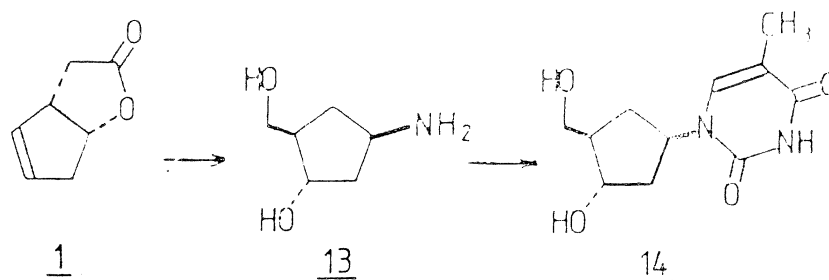
## Új tudományos eredmények

### 1. Optikailag aktív karbociklusos nukleozidok szintézise

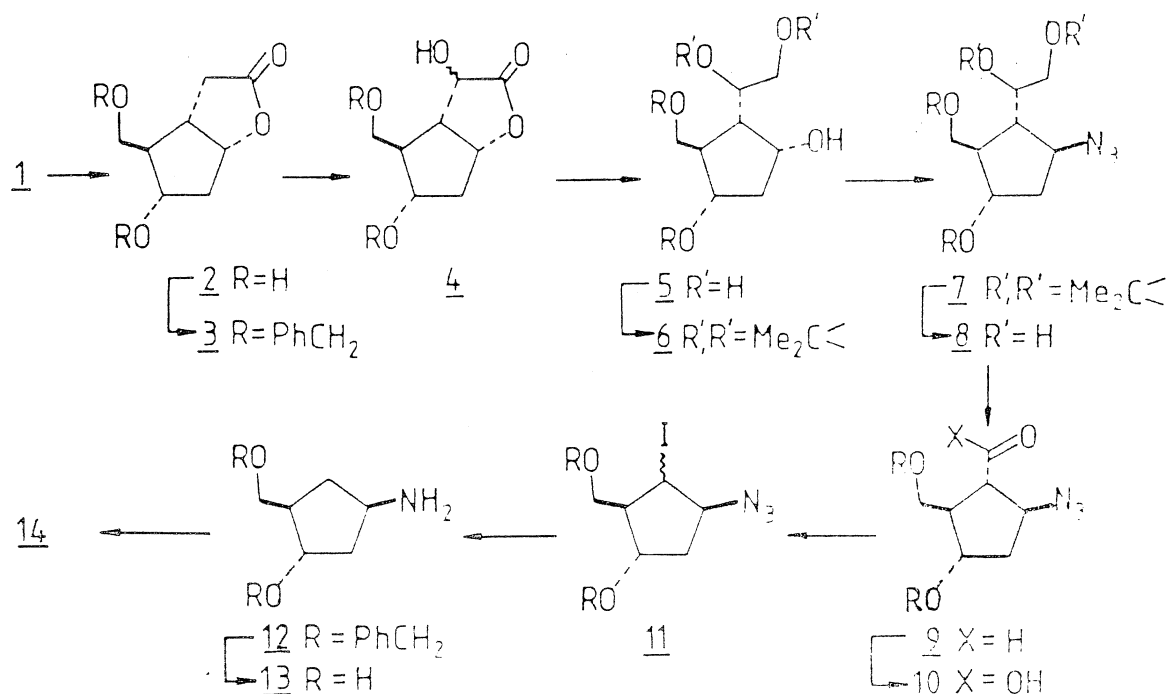
#### 1.1 A (+)-karbociklusos timidin első sztereospecifikus szintézise

A timidin karbociklusos analógja, a (+)-karba-timidin (14) szintézisét a prosztaglandin-kémiából (+)-G-lakton néven ismert telítetlen biciklusos laktonból (1) kiindulva kívántuk megvalósítani. Az 1 laktonból először preparálnunk kellett a (+)-(1R,2S,4R)-4-amino-2-hidroxi-1-ciklopentán-metanolt (13), ami az összes karba-2'-dezoxiribonukleozid szintézisének karbociklusos prekurzora.

Az 1-ből regio- és sztereoszelektív savkatalizált formaldehid addícióval (*Prins reakció*) kaptuk a dihidroxi laktont (2), amelyet a következő lépésben dibenzil éterré (3) alakítottunk át. A 3 hidroxilezése majd a kapott hidroxi-lakton (4) redukív hasítása után jó hozamal izoláltuk az 5 triolt, amelynek vicinális diol funkcióját dioxolán formában (6) védjük. A szabad 4-szekunder hidroxi csopor-



tot ezután inverzióval azidóra cseréltük. Az izopropilidén védőcsoport eltávolítása és a kapott szabad vicinális diol (8) perjodátos hasítása után csaknem kvantitatív hozammal preparáltuk a 9 aldehidet. A 9 krómsavas oxidációja és a kapott karbonsav (10) reakciója jódbenzol diacetát - jód reagenssel a 11 jódvegyület képződéséhez vezet. A 11 tributilónhidrides redukciója után csak ~20%-os hozammal kaptuk a 12 amino-vegyületet, amelynek elsődleges oka egy nemvárt intramolekuláris nukleofil szubsztitúció, amely egy kondenzált aziridin gyűrű kialakulásához vezetett. A 12 debenzilezése után a kívánt amino diol kulcsintermedierhez (13) jutottunk. A 13 acilezése  $\beta$ -metoxi-metakriloil izocianáttal vizes ammóniás gyűrűzárás után ~60%-os bruttó hozammal szolgáltatva a (+)-kibatimidint (14), amely korábban csak racém formában volt ismert.



1.2 A (+)-karba-2'-dezoxiadenozin sztereospecifikus szintézise.

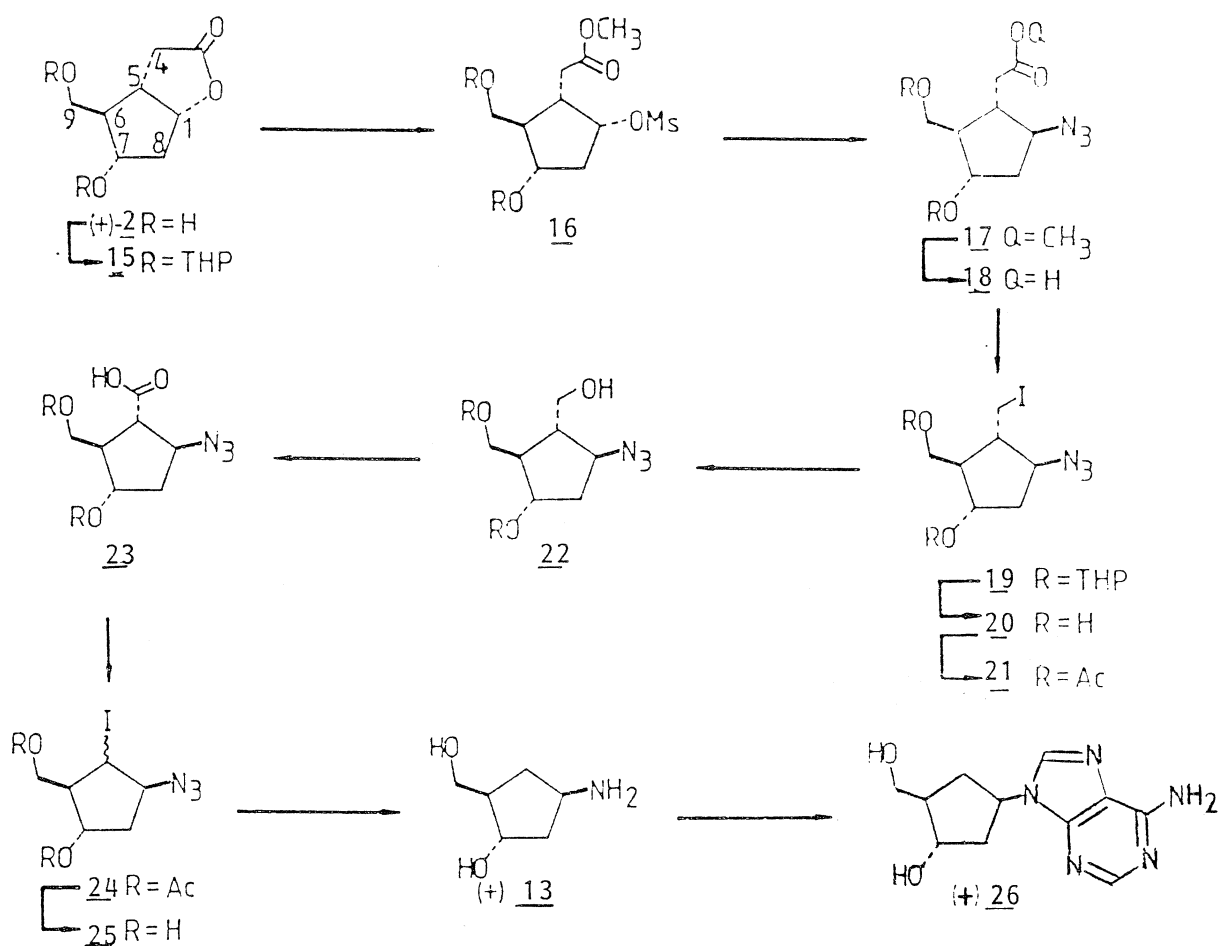
1.2.1 A (+)-(1R,2S,4R)-4-amino-2-hidroxi-1-hidroximetil-ciklopentán (13) javított szintézise.

Az 1→13 átalakítás az 1. fejezetben ismertett módon nagyon alacsony bruttó hozammal szolgáltatta a címben szereplő kulcsvegyületet. Tekintve, hogy a 13 többirányú felhasználása a szóbanforgó prekursor nagyobb mennyiségben történő előállítását tette szükségessé, így célul tűztük ki a teljes szintézis racionalizálását és a bruttó hozam növelését.

Az eredeti szintézis benzil védeése helyett, az első lépésben tetrahidropiraneztük a 2 laktondiolt, majd a laktongyűrű felnyitása és a karbonsav észterestése után a 4-hidroxi csoportot meziláltá (16) alakítottuk, úgy hogy az intermediereket nem izoláltuk. Az azido csoport bevitelét itt meziloxi→azid cserével valósítottuk meg, majd a 17 észter lúgos hidrolízise után kapott szabad karbonsavat (18) a már korábban alkalmazott karboxi→jód cserével a 19 jódmetil vegyületté alakítottuk át. A 19 oxidációja m-klórperbenzoesavval a 2-OTHP csoport nemvárt lehasadását és egy biciklusos termék képződését eredményezte, amelynek szerkezetét és keletkezésének feltételezett mechanizmusát a későbbiekben (1.4. fejezet) részletezzük. Az említett mellékreakció elkerülése céljából a THP védőcsoportokat a második lépésben acetilre cseréltük. Az így kapott diacetil vegyület (21) reakciója m-klórperbenzoesavval számottevő mellékreakció nélkül, ~70%-os hozammal szolgáltatta a 22 hidroximetil intermediert. A 22 oxidációja majd a kapott 23 dekarboxilezése után a 24 jódvegyületek keverékét kaptuk. A *transz* és *cisz* izomerek kromatográfiás elválasztása után csak a, mintegy ötszörös mennyiségű, tiszta *transz* jódvegyületet dezacetileztük. A sztereokémiaileg egységes 25 katalitikus hidrogénezésével ~60%-os termeléssel preparáltuk a kívánt (+)-13-t. Így az előző 11 lépéses szintézis bruttó 1,3%-os hozamát a viszonylag nagy veszteségekkel járó lépések kiküszöbölésével 10,6%-ra javítottuk.

### 1.2.2. A (+)-karba-2'-deoxiadenozin szintézise

A (+)-13 felhasználásával, ugyancsak elsőként, három lépésben szintetizáltuk a 2'-deoxiadenozin optikailag aktív, karbociklusos analógját (26). Az első lépés a 13 kondenzációja az 5-amino-4,6-diklórpirimiddel. Ezt követte a purin-gyűrűzárás majd az így kapott 6-klór-purin nukleozid ammonolízise a kívánt (+)-karba-2'-deoxiadenozint (26) szolgáltatva.

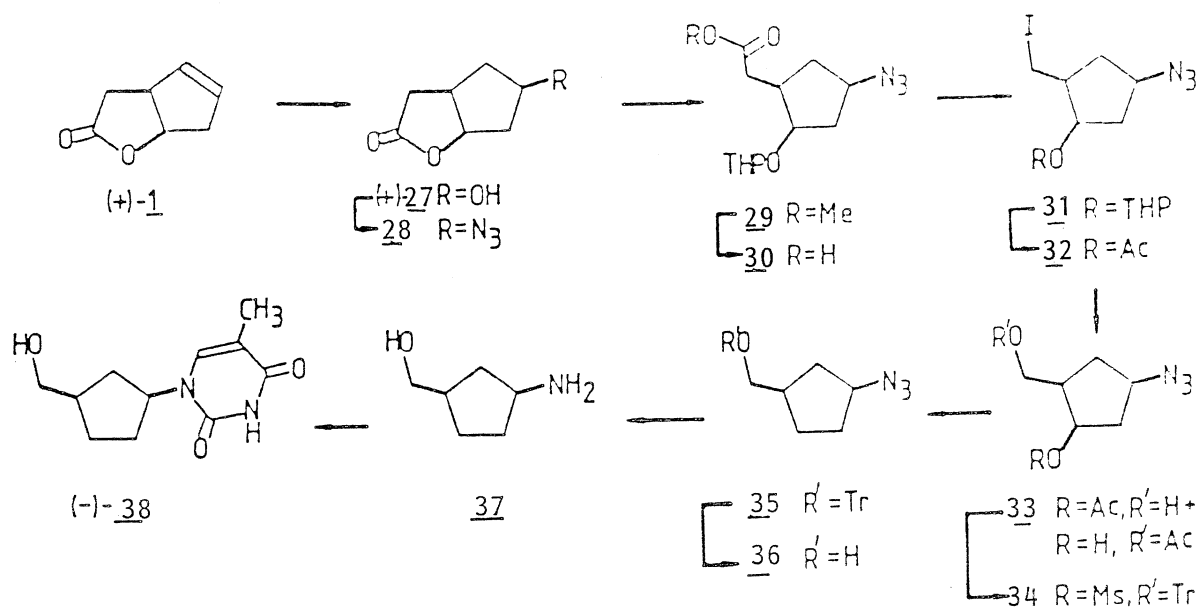


### 1.3. A (-)-karbociklusos 2',3'-dideoximitidin szintézise

A (+)-G-laktonból (1) kiindulva előállítottuk a 2',3'-dideoximitidin karbociklusos analógját, amely a természetes nukleozidok dideoxi analógjainak

figyelemreméltó anti-HIV aktivitása alapján potenciális antiretrovirális szernek tekinthető.

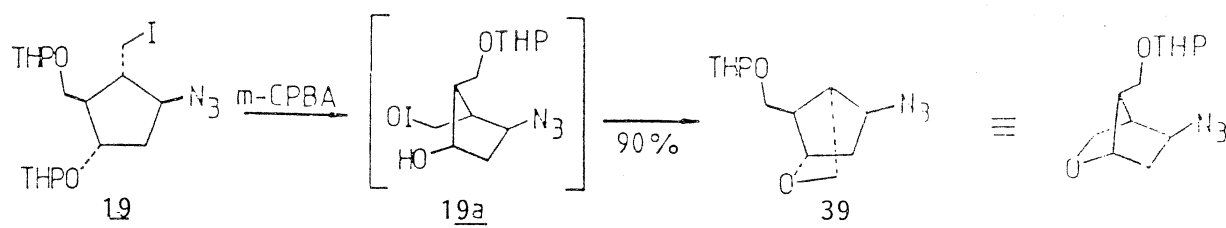
A szintézis kulcslépése a  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  nagyfokú régió- és sztereoselektivitással lejátszódó addíciója a 1 kettős kötésére. Az acetoximerkuri csoport redukzív eliminációja és az egyidejűleg végbemenő dezacetileződés után a 27 hidroxilaktonhoz jutottunk, amelyből kétszeres inverzióval az eredeti OH-val azonos térállású azido-laktont (28) kaptunk. A laktongyűrű felnyitása, a szekunder OH csoport THP védeése és a szokásos jódos dekarboxilezés után a 31 jódmetil vegyülethez jutottunk. A m-klórperbenzoesavas jód→hidroxici cseréje előtt ez esetben is célszerű volt a savérzékeny THP védőcsoport lecserélése acetilre. A primer OH csoport kialakítása után acetil-vándorlást figyeltünk meg, ami azonban a további átalakításokat nem befolyásolta. A teljes dezacetilezés és a primer OH tritilezése után az eliminálandó 2-OH-t mezileztük. Az így kapott védett azido-diol (34) detritilezése, majd a meziloxi csoport két lépésben lejátszódó redukzív eliminációja, végül az azido csoport redukciója után sztereokémiaileg egységes 4-amino-ciklopentán-metanolhoz (37) jutottunk. Ebből az 1.1. fejezetben leírt módon, két lépésben preparáltuk a (-)-carba-2',3'-didezoxitimidint (38).



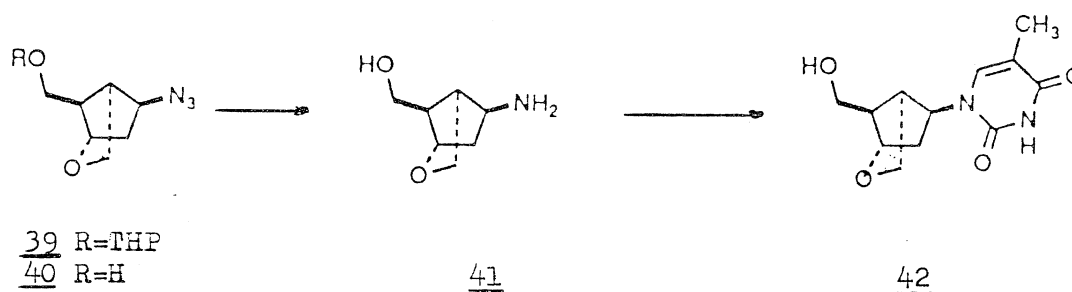
#### 1.4. Ciklopentán részen módosított karbociklusos timin nukleozidok szintézise

Az előző fejezetekben szereplő 19 és 33 intermedierekből kiindulva négy további optikailag aktív, karbociklusos timin nukleozidot állítottunk elő.

1.4.1. A 19 m-klórperbenzoesavas oxidációja a várt 22 helyett a 19a intermediereen keresztül csaknem kvantitatív hozammal szolgáltatta a 39 diszubsztituált 2-oxabicyklo[2.2.1]heptánt



A 39 felhasználásával három lépésben állítottuk elő a (+)-karba-3'-O,6'-metilén-timidint (42).



1.4.2. A 19 jódmetil vegyületet  $\text{NaBH}_4$ -del redukálva az 5-metil analóg (43) ~60%-os termeléssel preparálható. A védőcsoportok eltávolítása és az azido funkció redukciója után kapott amin-prekursor (45) acilezésével az eddigiekkel azonos módon állítottuk elő a (+)-(6'S)-karba-6'-metil-timidint (46).





tritilezése után a karbociklusos (+)-2',3'-O-anhidro-timidint (53) izoláltuk az utolsó két lépésre számított igen jó hozammal.

## 2. 8-Szubsztituált 2'-dezoxiadenozin analógok szintézise

### 2.1 8-(1-alkin-1-il)-2'-dezoxiadenozinok előállítása

A 2'-dezoxiadenozinokból könnyen preparálható 8-brómvegyület (54) és különböző terminális alkinok palládium-katalizálta kapcsolásával négy, új 8-alkinil-dA analógot (55, 56, 57, 58) állítottunk elő. Tapasztalataink szerint a 3',5'-szabad 54-ből kiindulva a kapcsolások főként a hosszabb szénláncú származékok (57 és 58) esetében eredményeztek magas (80 -90%-os) kitermelést.

### 2.2. (Z)-8-(1-alken-1-il)-2'-dezoxiadenozinok előállítása

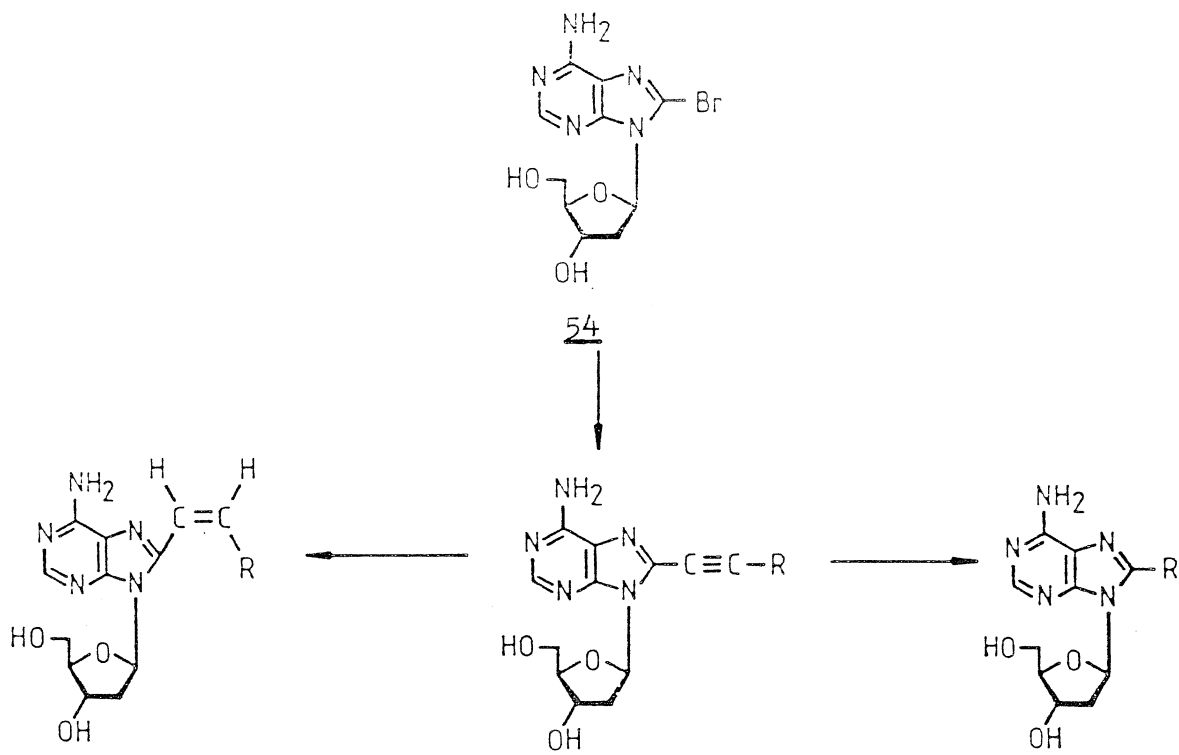
Az 56, 57 és 58 alkinil vegyületek Lindlar katalizátor jelenlétében végrehajtott katalitikus hidrogénezése a megfelelő *cisz* alkenil származékok (59, 60 és 61) mint domináns főtermékek képződéséhez vezetett.

A 60 és 61 Z-alkenil származékok a  $^1\text{H}$  NMR spektrumok szerint 4 ill. 7% *transz* izomert is tartalmaztak, míg az 59 teljesen tisztának bizonyult. Ugyanakkor az 59 oszlopkromatográfiás tisztítása során 14% 8-propil-dA-t (63) is izoláltunk, ami arra utal, hogy az oldallánc hosszának csökkenésével a kettős kötés telítése is könnyebbé válik.

### 2.3. 8-Alkil-2'-dezoxiadenozinok előállítása

Az alkinilvegyületek 10%-os Pd-C jelenlétében, atmoszférikus nyomáson végrehajtott hidrogénezésével a megfelelő 8-n-alkil származékokhoz (62, 63, 64 és 65) jutottunk. A hozam minden esetben gyakorlatilag kvantitatív volt. Az álta-

lunk alkalmazott módszer, amely lehetővé teszi tetszőleges lánchosszúságú alkenil- és alkil-purin nukleozidok előállítását, különösen a 4 C-atomosnál hosszabb oldalláncú analógok szintézisének előnyös, mivel ezeknél a lehetséges alternatív módszerek (mint trialkilaluminium vagy tetraalkilón reagensek) alkalmazása igen nagy nehézségekkel járna.



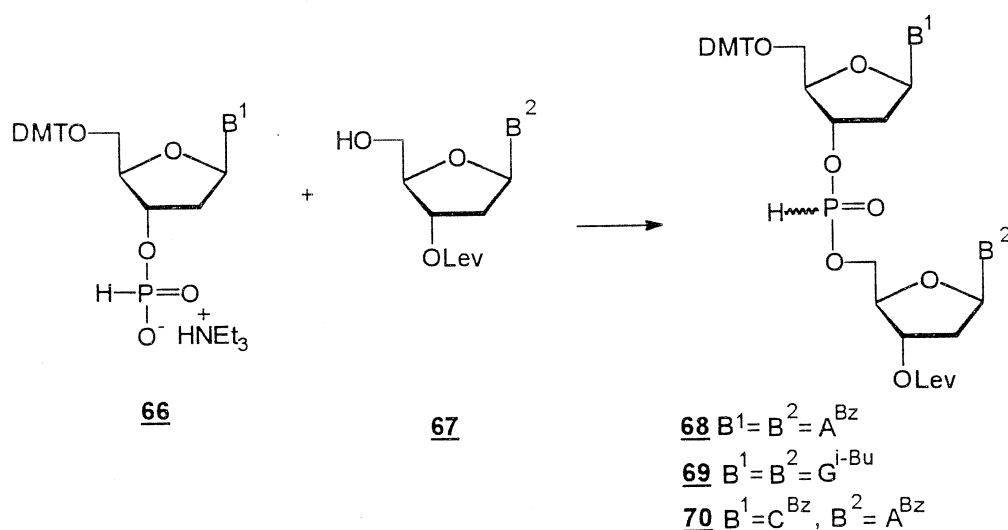
	<u>R</u>		<u>R</u>		<u>R'</u>
<u>59</u>	CH <sub>3</sub>	<u>55</u>	H	<u>62</u>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
<u>60</u>	n · C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	<u>56</u>	CH <sub>3</sub>	<u>63</u>	n · C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
<u>61</u>	n · C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	<u>57</u>	n · C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	<u>64</u>	n · C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
		<u>58</u>	n · C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	<u>65</u>	n · C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>

### 3. Foszfátrészen módosított dinukleotidok és ezek aktív 3'-foszfitjainak szintézise

Antisense oligomerekbe történő beépítés céljából célul tűztük ki foszfor-sztereokémiaailag egységes foszfát-módosított dinukleotidok szintézisét.

### 3.1. Dinukleozid H-foszfónátok előállítása és kémiai stabilitásának vizsgálata

Bázis védett 5'-O-dimetoxitritil-nukleozid-3'-H-foszfónátok (66) és 3'-O-levulinil-nukleozidok (67) pivaloilklorid katalizálta kondenzációjával három dinukleozid-H-foszfónátot állítottunk elő P-diasztereomerkeverék formában.



A 68 és 69 diasztereomerkeverékek oszlopkromatográfiai szétválasztása során megállapítottuk, hogy a H-foszfónát-diaszterek a 66 monészterektől eltérően alkohol és bázis jelenlétében bázis-katalizálta átésztereződést szenvednek, aminek következtében mindkét H-foszfónát-diaszter-kötés gyakorlatilag azonos mértékben felhasad. Ezt bizonyítja, hogy kromatográfia után a kiindulási 67 és 66 defoszforileződött bomlástermékét közel azonos mennyiségben izoláltuk.

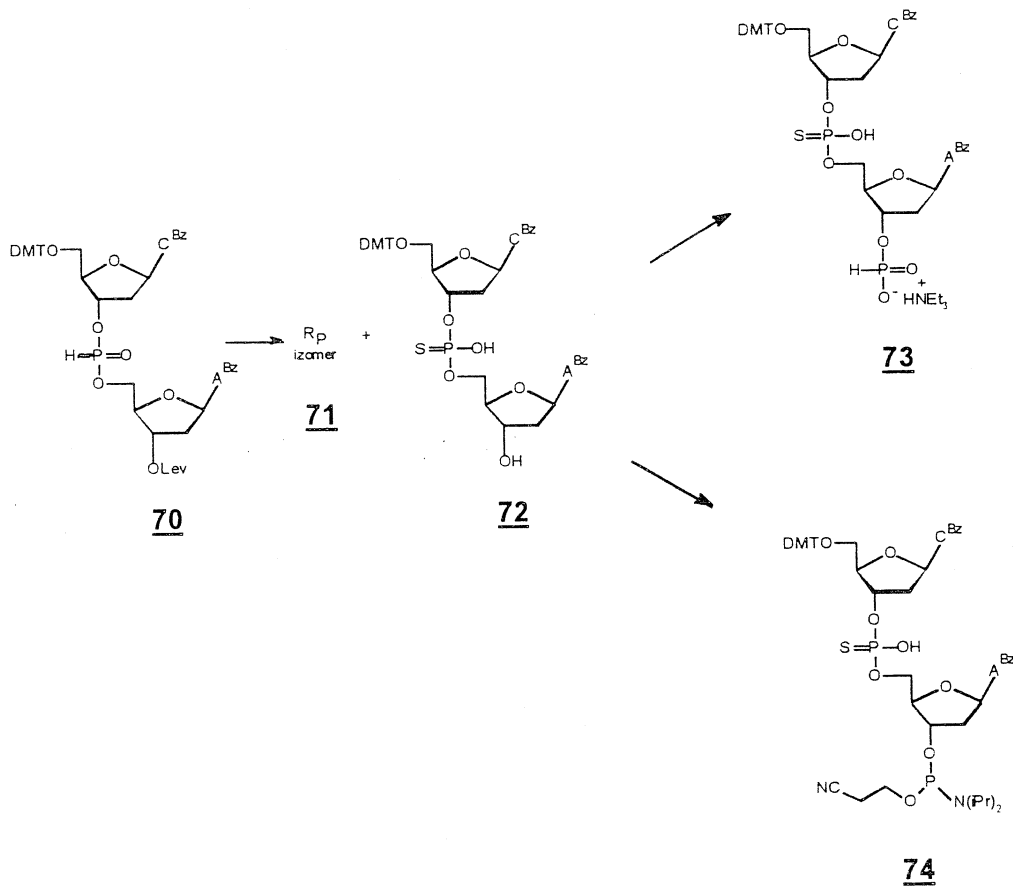
### 3.2. Dinukleozid foszforotioátok aktív 3'-foszfitjainak szintézise

A 70 P-diasztereomerkeverék kénezése és delevulinilezése, majd az  $R_P$  és  $S_P$  izomerek kromatográfiai szétválasztása után csaknem kvantitatív termeléssel kaptuk a 71 és 72 sztereokémiaiilag egységes, 3'-szabad dinukleozid foszforotioátokat.

A 72-t *tris*-(1,2,4-triazol-1-il)-foszfínnal reagáltatva azt találtuk, hogy a reakció egyirányú és a kívánt P-tioát-dimer-3'-H-foszfónát (73) képződéséhez vezet.

A 72 reakciója *bisz*-(diizopropilamino)- $\beta$ -cianoetil-foszfíttal ugyancsak egyértelműen a várt dinukleotid-3'-(diizopropilamino- $\beta$ -cianoetil)-foszfit (74) képződését eredményezi.

Az előbbi két kísérlettel igazoltuk, hogy az oligomerek szintéziséhez felhasználható 73 és 74 aktív foszfitok a tiofoszfát részen védetlen dinukleotidokból is előállíthatók, mivel a foszfitilező reagensek kizárólag a 3'-OH csoporttal reagálnak.



## Az eredmények gyakorlati jelentősége

A szintetizált új karbociklusos és 8-szubsztituált purin nukleozidok antivirális aktivitásának vizsgálata minden esetben megtörtént. Közülük a (+)-karba-timidin és dezoxiadenozin valamint a 8-heptinil-dezoxiadenozin bizonyult hatásosnak néhány humán herpeszvírus törzssel szemben.

A sztereokémiailag egységes foszforotioát dinukleotidok beépítése - a korábbi vizsgálatok alapján igen jelentős - anti-HIV aktivitással rendelkező oligomerbe, várhatólag tovább növeli annak biológiai hatékonyságát.

## PUBLIKÁCIÓJEGYZÉK

- 1.) J. Béres, Gy. Sági, W.G. Bentrude, J. Balzarini, E. De Clercq and L. Ötvös:  
Synthesis and antitumor and antiviral properties of 5-halo and 5-(trifluoromethyl)-2'-deoxyuridine 3',5'-cyclic monophosphates and neutral triesters.  
J. Med. Chem. 29, 1243-1249 (1986)
- 2.) J. Béres, Gy. Sági, E. Baitz-Gács, I. Tömösközi and L. Ötvös:  
Stereospecific synthesis of (+)-carbocyclic 2'-deoxyadenosine. An improved procedure for the preparation of (+)-(1R,2S,4R)-4-amino-2-hydroxy-1-hydroxy-methylcyclopentane.  
Tetrahedron Lett. 44, 6207-6216 (1988)
- 3.) J. Béres, Gy. Sági, E. Baitz-Gács, I. Tömösközi, L. Gruber and L. Ötvös:  
Synthetic Studies Towards (-)-Carba-3'-Deoxy-3'-Fluorothymidine.  
Tetrahedron 45, 6271-6280 (1989)
- 4.) J. Sági, J. Szécsi, A. Szemző, Gy. Sági, L. Ötvös:  
Carbocyclic analogues of dTTP and UTP: properties in polymerase enzyme-catalyzed reactions.  
Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 18, 131-135 (1987)
- 5.) L. Ötvös, J. Béres, Gy. Sági, I. Tömösközi, L. Gruber:  
The first stereospecific synthesis of (+)-(1R-2S,4R)-4-amino-2-hydroxy-1-cyclopentanemethanol and (+)-carbocyclic thymidine  
Tetrahedron Lett. 28, 6381-6384 (1987)

- 6.) J. Béres, Gy. Sági, I. Tömösközi, L. Gruber, E. Gulácsi, L. Ötvös:  
Stereospecific Synthesis of (-) Carbocyclic 2',3'-dideoxythymidine, a Potential Anti-AIDS Agent.  
Tetrahedron Lett. 29, 2681-2684 (1988)
- 7.) A. Kálmán, T. Koritsánszky, J. Béres, Gy. Sági:  
Crystal and Molecular Structure of (+)-Carba-thymidine.  
Nucleosides Nucleotides 9, 235-243 (1990)
- 8.) J. Béres, Gy. Sági, I. Tömösközi, L. Gruber, Baitz-Gács E., L. Ötvös, De Clercq E.:  
Stereospecific Synthesis and Antiviral Properties of Different Enantiomerically Pure Carbocyclic 2'-Deoxyribonucleoside Analogues Derived from Common Chiral Pools: (+)-(1R,5S) and (-)-(1S,5R)-2-Oxabicyclo (3,3,0)octe-6-en-3-one.  
J. Med. Chem. 33, 1353-1359 (1990)
- 9.) K. Szűcs, Gy. Sági, Gy. Vereb:  
Effect of Some New cAMP Analogs on cAMP-dependent Protein Kinase Isoenzymes.  
Int. J. Biochem. 24, 915-921 (1992)
- 10.) Gy. Sági, K. Szűcs, Gy. Vereb, L. Ötvös:  
Synthesis and Enzymatic Activity of Some New Purine Ring System Analogues of Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate.  
J. Med. Chem. 35, 4549-4556 (1992)
- 11.) J. Sági, A. Szemző, K. Ébinger, A. Szabolcs, Gy. Sági, É. Ruff, L. Ötvös:  
Base-modified Oligodeoxynucleotides. I. Effect of 5-Alkyl, 5-(1-Alkenyl) and 5-(1-Alkynyl) Substitution of the Pyrimidines on Duplex Stability and Hydrophobicity.  
Tetrahedron Lett. 34, 2191-2194 (1993)
- 12.) Gy. Sági, L. Ötvös, S. Ikeda, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq:  
Synthesis and Antiviral Activities of 8-Alkynyl-, 8-Alkenyl- and 8-Alkyl-2'-Deoxy-adenosine Analogues.  
J. Med. Chem. közlésre elfogadva.

### SZABADALOM

Ötvös L., Sági J., Szemző A., Sági Gy., Szabolcs A., Ruff É., Ébinger K., Tüdös H., Fellegvári I.:  
Gyógyszercélú felhasználásra alkalmas 5-alkil, 5-(1-alkenil) és 5-(1-alkinil)-pirimidin bázisokat tartalmazó 2'-dezoxi-oligonukleotidok.  
Magyar szabadalom P 93-00174.

**ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK**

- 1.) Sági Gy., Ötvös L.:  
Purin-vázanalóg ribofuranozidok szintézise új ribozilező ágensek felhasználásával.  
MKE Kémiai Előadói Napok, VII. Tudományos Szimpózium, Szeged, 1984, Abstr. p. 41.
- 2.) Rákóczy P., Sági Gy., Ötvös L.:  
Természetes purin-dezoxiribonukleozidok antipódjainak szintézise.  
MKE Vegyészkonferencia, Pécs, 1985, Abstr. p. 269.
- 3.) Sági J., Szemző A., Szécsi J., Sági Gy., Ötvös L.:  
Carbocyclic analogues of dTTP and UTP: substrate properties in polymerase enzyme reactions.  
Antiviral Drug Development: a Multidisciplinary Approach, NATO Advanced Study Institute, FEBS Advanced Course, Il Ciocco, Italy, 1987.
- 4.) Béres J., Tömösközi I., Gruber L., Sági Gy., Ötvös L.:  
Ciklopentilamin származékok szintézise.  
MKE Vegyészkonferencia, Debrecen, 1987, Abstr. p. 118.
- 5.) Béres J., Sági Gy., Tömösközi I., Gruber L., Ötvös L.:  
Stereospecific synthesis of enantiomerically pure carbocyclic analogues of nucleosides.  
7th IUPAC Conference on Organic Synthesis, Nancy, France, 1988.
- 6.) Szemző A., Sági J., Sági Gy., Ötvös L.:  
Solid-phase synthesis and bio-organic properties of (+)-carbocyclic-(dT)<sub>10</sub>  
5th FECHM Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry,  
Bechyne, Czechoslovakia, 1988, Abstr. p. 9.
- 7.) Sági Gy., Ötvös L.:  
2'-Deoxygenation Among Carbocyclic Pyrimidine Nucleosides.  
F.E.C.H. 5th International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products.  
Varna, Bulgaria, 1989, Abstr. p. 3, 328-331.
- 8.) Béres J., Sági Gy., Tömösközi I., Gruber L., Ötvös L.:  
Optikailag aktív karbociklusos nukleozidok szintézise.  
MKE Vegyészkonferencia, Szombathely, 1989, Abstr. p. 75.
- 9.) Szűcs K., Sági Gy., Vereb Gy.:  
Effect on cAMP-analogues on cAMP-dependent Protein Kinase Isoenzymes.  
20th Meeting of FEBS, Budapest, 1990.